

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

FERNANDA MORTENI DE OLIVEIRA PAULUCIO

INFLUÊNCIA DO TABAGISMO NA METILAÇÃO DO DNA

Trabalho de Conclusão de Curso no formato de artigo científico ao UniCEUB como requisito parcial para conclusão do Curso de Bacharelado em Biomedicina, sob orientação do Prof. Dr. Paulo Roberto Queiroz.

BRASÍLIA

2017

Influência do tabagismo na metilação do DNA

Fernanda Morteni de Oliveira Paulucio¹

Paulo Roberto Queiroz²

Resumo

Epigenética corresponde a mudanças que ocorrem no código genético, sem modificar a sequência de bases do DNA. O objetivo deste trabalho foi relacionar os efeitos do tabagismo com a metilação do DNA. Trata-se de uma revisão em formato narrativo, em que foram observados as modificações epigenéticas ocasionados pelo fumo, contribuindo para expressão fenotípica de várias doenças, principalmente cânceres, doenças cardiovasculares e pulmonares. Na molécula de DNA ocorre apenas o silenciamento de genes, denominada de metilação, ou seja, o grupamento metil é adicionado na citosina precedente de uma guanina, resultando na ausência de expressão gênica. Fatores externos estão relacionados com a modulação do radical metil, dentre eles é possível citar o cigarro, que está associado ao desenvolvimento de tumores. Dessa forma, é importante a conscientização da população dos riscos ocasionados pelo tabaco, observando ainda que ao parar de fumar é possível recuperar o estado de metilação do DNA.

Palavras chave: tabagismo, cigarro, metilação do DNA, epigenética.

Influence of smoking on DNA methylation

Abstract

Epigenetics corresponds to changes that occur in the genetic code, without modifying the DNA base sequence. The aim of this work is to relate the effects of smoking to DNA methylation. It is a review in narrative format, in which were observed the epigenetic modifications caused by smoking, contributing to the phenotypic expression of several diseases, mainly cancers, cardiovascular and pulmonary diseases. In the DNA molecule only gene silencing occurs, called methylation, that is, the methyl grouping is added to the previous cytosine of a guanine, resulting in the absence of gene expression. External factors are related to the modulation of the methyl radical, among them can be mentioned the cigarette, which is associated with the development of tumors. Thus, it is important to raise awareness of the risks of tobacco, noting that stopping smoking can restore the methylation status of the DNA.

Keywords: smoking, cigarette, DNA methylation, epigenetics.

¹ Graduanda do curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.

² Doutor em Biologia Animal pela Universidade de Brasília – UnB, Professor de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília.

1 Introdução

O termo epigenética corresponde às modificações no código genético, herdáveis durante a divisão celular, porém que não mudam as sequências de bases do DNA. Os fatores ambientais influenciam os padrões epigenéticos que podem gerar mudanças no fenótipo do indivíduo, transmitindo para as próximas gerações (MULLER; PRADO, 2008).

As variações não-genéticas adquiridas durante a vida do indivíduo e que são transmitidas para os descendentes, ou seja, a herança epigenética, ocorre por meio de mudanças químicas na molécula de DNA e nas proteínas que o envolvem, ou seja, as histonas (FANTAPPIÉ, 2013).

Oliveira e colaboradores (2010) descrevem que as histonas sofrem modificações como metilação, ubiquitinação, acetilação e fosforilação. Na molécula de DNA ocorre apenas o silenciamento de genes, ou seja, a metilação, que constitui em uma modificação química covalente na qual ocorre uma transferência do grupamento metil ($-\text{CH}_3$) da S-adenosilmetionina para o carbono 5 de uma citosina, formando assim 5-metil-citosina (5-MeC) que na maioria das vezes precede uma guanina (dinucleotídeo CpG – Citosina pré Guanina).

A metilação exerce importantes funções no desenvolvimento embrionário normal, inativação do cromossomo X, regulação gênica, *imprinting* genômico e modificações da cromatina (COSTA; PACHECO, 2013).

Segundo Oliveira e colaboradores (2010) a adição de radical metil em uma citosina que precede uma guanina (CpG) pode provocar a inibição da ligação de fatores de transcrição que, conseqüentemente, resultarão na ausência de expressão gênica. Dessa forma, além da dieta, da qual se obtém o radical metil, outros fatores ambientais têm sido envolvidos na modulação da metilação, como os medicamentos, íons metálicos, fungicidas e cigarro. Estes agentes podem causar a metilação ou desmetilação no código genético do indivíduo, modificando significativamente a expressão gênica.

Em 2001 foi criado o Projeto Epigenoma Humano (HEP), que tem o propósito de identificar, classificar e interpretar a importância gênica dos padrões de metilação em todos os genes, na maioria dos tecidos. Para o projeto experimental inicial foram desenvolvidas tecnologias para a análise dos estudos epigenéticos, abrangendo tratamentos utilizando bissulfito de sódio e também a utilização da PCR e sequenciamento para analisar e quantificar os padrões de metilação do genoma (MULLER; PRADO, 2008).

Devido à sua capacidade de alterar o genoma e causar silenciamento ou ativação de determinados genes o hábito de fumar está associado ao desenvolvimento de tumores. O fumo do tabaco é um agente causador de alguns tipos de câncer, principalmente um de seus compostos, a nicotina, que pode induzir diretamente a metilação do DNA (OLIVEIRA, 2011). O fumo contém mais de 1.017 partículas e muitas são produtos oxidantes. Em resposta à fumaça do cigarro, muitas células inflamatórias migram para o pulmão, as quais também geram mais agentes oxidantes (RUFINO; SILVA, 2006).

Oliveira (2011) descreve que artigos revelam alterações epigenéticas em genes supressores tumorais (*p16*), genes relacionados ao ciclo celular (*DAPK* e *TERT*), genes envolvidos com a apoptose (*Bcl2*) e outros genes, envolvidos com diferentes vias do metabolismo da célula (*RAR α* , *FHIT*, *CYP1A1*, *P450*, *PTGS2*, *EDNRB*, *SOCS1*, entre outros). Esses genes têm sido estudados com atenção voltada para as modificações químicas, isto é, com enfoque epigenético, incluindo estudos a respeito do câncer, doenças inflamatórias e até envelhecimento.

A fumaça do cigarro contribui para o estresse oxidativo. A produção de espécies reativas de oxigênio pode danificar o DNA, causando mutações, deleções, alterações no açúcar das bases, halogenação ou oxidação de citosinas (OLIVEIRA, 2011).

De acordo com Yildirim (2011) o principal efeito adverso ocasionado pelo tabagismo, tanto ativo como passivo, é em virtude da grande quantidade de compostos que são emitidos em gases, muitos dos quais são pró-oxidantes e oxidantes. Entre os efeitos negativos do tabagismo, observa-se também o aumento da produção de radicais livres que, por consequência, aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).

No Brasil os dados analisados apontam para uma redução da prevalência do consumo de cigarros entre os adultos. Em 1989, 32% da população era fumante, já em 2003 ocorreu uma diminuição para 22,4% e em 2008 para 17,2%. Entre os anos de 1989 e 2003 a queda para os homens foi de 43,3% para 27,1% e de 27% para 18,4% para as mulheres (PAES, 2016). Nas pesquisas realizadas por Malta e colaboradores (2015) apontaram que ocorreu uma redução da prevalência do tabagismo em 19% entre os anos de 2008 e 2013, caracterizando uma diminuição expressiva ocorrido em todo o Brasil, tanto na zona rural quanto urbana, em todas as faixas etárias, escolaridades e raça/cor, na maioria dos Estados.

Desse modo o presente trabalho teve como objetivo relacionar os efeitos do tabagismo e sua associação com a metilação do DNA.

2 Metodologia

Trata-se de um trabalho de revisão narrativa da literatura que consiste em uma temática mais livre; dificilmente parte de uma questão específica bem definida, não exigindo um protocolo rígido para sua confecção; a busca das fontes não é pré-determinada e específica, sendo frequentemente menos abrangente (CORDEIRO et al., 2007).

Com isso, foram realizadas pesquisas de artigos utilizando os bancos de dados bibliográficos EBSCOhost, SciELO (*Scientific Eletronic Library Online*), PubMed (*US National Library of Medicine*) e Google Acadêmico, por meio da utilização das seguintes palavras-chave: “tabagismo”, “cigarro”, “metilação do DNA”, “epigenética”, bem como os mesmos no idioma inglês.

A pesquisa foi concentrada em artigos publicados nos últimos 10 anos, porém artigos mais antigos foram utilizados para embasamento do presente trabalho. Após a busca na literatura, foi realizada seleção dos artigos que abordavam aspectos relacionados à associação entre a metilação do DNA com tabagismo.

3 Desenvolvimento

3.1 Química do cigarro

Na fumaça do cigarro é possível observar mais de 4000 substâncias tóxicas que atuam em diferentes sistemas e órgãos. Dentre essas substâncias existem algumas com maior potencial de colaboração do surgimento e desenvolvimento do câncer. Como exemplo, a nicotina que é a principal causadora do vício e provoca a diminuição da chegada do sangue no SNC (sistema nervoso central) e tecidos; o benzopireno que é responsável por facilitar a combustão entre o papel que envolve o fumo; nitrosaminas; substâncias radioativas (Polônio 210 e Carbono 14); agrotóxicos (DDT); metais pesados (Chumbo e Cádmio) que se concentram principalmente no fígado, rins e pulmões; solventes (Benzeno); níquel e arsênio que ficam armazenados no fígado, rins, coração, pulmões, ossos e dentes; cianeto hidrogenado; amônia; formol; alcatrão; e o monóxido de carbono que tem maior afinidade pela hemoglobina, substituindo o oxigênio (SILVA, 2006).

No processo de combustão da folha do tabaco, ocorre um aumento de dezesseis para 50 substâncias químicas consideradas como cancerígenas (NUNES, 2006). De acordo com Silva (2006) durante o ato de fumar, a nicotina é absorvida pelos pulmões, sendo levada para o

coração e, pelo sangue arterial, atinge o cérebro e outras partes do corpo. No SNC a substância atinge receptores ligados às sensações de prazer, ocasionando bem-estar.

3.2 Efeitos do tabagismo

De acordo com Martins e colaboradores (2016) o tabaco é responsável por mais de 50 doenças diferentes, principalmente cardiovasculares e respiratórias.

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (2007) o cigarro é responsável por 90% dos casos de câncer no pulmão, 85% dos relatos de morte por DPOC (doença pulmonar obstrutiva crônica), 45% dos infartos do miocárdio que levaram a morte, 30% dos óbitos por câncer e 25% dos óbitos por derrames.

A utilização do tabaco potencializa o processo de formação de aterosclerose nas coronárias e em outras artérias, podendo levar a doença arterial periférica. Os efeitos maléficos do tabagismo e a deposição de ateromas nos vasos sanguíneos aumentam a viscosidade do sangue e alteram as plaquetas, mudando consequentemente o perfil lipídico do indivíduo. O tabaco prejudica a elasticidade das artérias e induz à vasoconstrição. A nicotina e o monóxido de carbono presentes no tabaco são as substâncias tóxicas mais prejudiciais para as coronárias, levando ao infarto do miocárdio (MARTINS et al., 2016). O risco de doenças cardiovasculares pode aumentar devido a associação do hábito de fumar e fatores de risco, como colesterol elevado, hipertensão ou obesidade (NUNES, 2006).

O ato de fumar, causa uma reação inflamatória que pode provocar um acesso de tosse como consequência da fumaça do cigarro em alta temperatura nas vias aéreas. A produção de radicais livres e a elevação térmica são provocadas pela combustão do cigarro, que por consequência prejudica os pulmões. Devido a toxicidade e altas temperaturas, as paredes respiratórias sofrem o processo de substituição de células, ocasionando o muco, que auxilia na retirada de substâncias prejudiciais, como a fumaça do cigarro. O muco produzido pode originar a bronquite crônica e o enfisema pulmonar (MARTINS et al., 2016).

Atualmente o tipo histológico frequentemente observado é o adenocarcinoma, com evidências de cânceres mais periféricos, devido à profunda inalação do fumo, provavelmente em resultado a cigarros com o teor de nicotina diminuídos (NUNES, 2006).

Segundo Martins e colaboradores (2016) a nicotina atinge rapidamente o cérebro, que libera substâncias como a dopamina, responsável pela sensação de prazer, mas que depois de pouco tempo gera a dependência química.

Nunes (2006) descreve que em novos usuários a nicotina, um estimulante psicomotor, diminui o estresse, a ansiedade e o apetite, melhorando a memória e a atenção. Porém, o uso

pode levar a tolerância, a exposição repetida da mesma quantidade reduz os efeitos primários o que pode ocasionar um aumento de doses de consumo.

Os fatores genéticos podem explicar em parte os diferentes graus de dependência a nicotina, embora a maioria dos fumantes apresentem dependência às substâncias do cigarro. A maioria da metabolização da nicotina em cotinina ocorre no fígado, dependendo primeiramente da ação do citocromo P450 (CYP), que se apresenta de diferentes formas ou isoenzimas (CYP2A6). Os metabolizadores rápidos tendem a fumar mais, para manter os níveis sanguíneos e cerebrais de que necessitam constantes, e os metabolizadores lentos da nicotina fumam menos (NUNES, 2006).

No estudo realizado por Nakajima e colaboradores (2002) foi determinado o polimorfismo genético do gene *CYP2A6*, citando os diferentes alelos *CYP2A6*1A*, *CYP2A6*1B*, *CYP2A6*2*, *CYP2A6*3*, *CYP2A6*1X2*, *CYP2A6*4*, *CYP2A6*5*, *CYP2A6*6*, *CYP2A6*7*, *CYP2A6*8*, *CYP2A6*9*, *CYP2A6*10*, *CYP2A6*11*. Esses pesquisadores realizaram uma genotipagem do gene *CYP2A6* em 92 japoneses e 209 coreanos, entre eles, 3 japoneses e 4 coreanos que eram absolutamente deficientes na formação de cotinina foram genotipados *CYP2A6*4* / *CYP2A6*4*. Os outros metabolizadores pobres cujo metabolismo da nicotina é deficiente foram genotipados como *CYP2A6*7* / *CYP2A6*4* ou *CYP2A6*10* / *CYP2A6*4*, ou seja, a atividade enzimática do *CYP2A6* é perdida nos indivíduos que apresentam homozigose para os alelos *CYP2A6*4*, *CYP2A6*7*, *CYP2A6*10*, ou heterozigose para estes alelos em combinação.

Nakajima e colaboradores (2002) descrevem que em estudos *in vitro* o *CYP2A6*5* e *CYP2A6*11* inibem catabolicamente a enzima redutase, porém os efeitos destes alelos sobre o metabolismo da nicotina são desconhecidos, pois os indivíduos que possuem esses alelos eram heterozigotos no estudo. Em japoneses com *CYP2A6*4* / *CYP2A6*4* os níveis de cotinina urinária foram baixos, além disso, foi relatado que um indivíduo com *CYP2A6*2* / *CYP2A6*2* era deficiente em metabolismo da nicotina para a cotinina. No estudo um indivíduo coreano que possui o alelo *CYP2A6*1X2* não mostrou um aumento do metabolismo da nicotina, portanto, não está clara a relação do alelo *CYP2A6*1X2* com o metabolismo da nicotina. Com isso, concluíram que os fumantes que possuem um alelo defeituoso de *CYP2A6* podem absorver menos nicotina por cigarro para manter o nível desejado de nicotina no organismo.

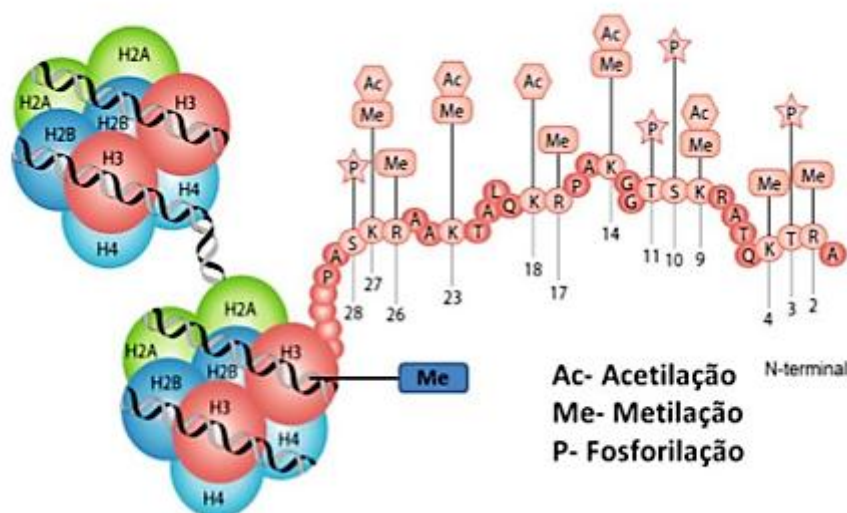
3.3 Epigenética e a Metilação do DNA

Consolaro (2009) afirma que na epigenética os fatores bioquímicos que agem na expressão dos genes (ligando e desligando) estão relacionados com o meio ambiente no qual o organismo se encontra. Os nucleotídeos não precisam ser alterados para que os genes sofram adaptações na adequação da célula ou organismo ao meio ambiente onde se vive. Alternativamente, os genes podem ser desativados.

A atividade epigenética pode ser transmitida para as células descendentes, mantendo um padrão durante gerações. Com isso, o fenótipo do indivíduo não é resultado apenas da composição genética, mas também das alterações epigenéticas, o epigenótipo (COSTA; PACHECO, 2013).

De acordo com Noro e Gon (2015) na expressão do gene ocorre a transcrição do DNA para um RNA mensageiro e depois a tradução para formar uma proteína, que consiste em uma sequência de aminoácidos. O DNA está presente no núcleo celular de uma maneira compacta envolto por proteínas histonas, impedindo a expressão do gene e, conseqüentemente, o RNA não será produzido. Para que os genes tenham um efeito biológico devem ser expressos, ou seja, devem ser liberados da estrutura densa (heterocromatina) onde se encontram. As modificações epigenéticas podem ocorrer nas duas histonas interligadas nas partes caudais, atingindo o objetivo de tornar as histonas menos atraídas pelo DNA. Estas modificações podem ocorrer por acetilação (adição do grupo acetil $-\text{COCH}_3$), metilação (adição do grupo metil $-\text{CH}_3$), desacetilação (remoção do grupo acetil), fosforilação (adição do grupo fosfato $-\text{PO}_4^{-3}$) (Figura1), ou ubiquitinação que consiste na marcação da histona pela proteína ubiquitina. Com isso, a adição ou remoção de alguma estrutura química nas histonas modifica a interação com o DNA.

Figura 1: Modificações químicas que podem ocorrer na cauda das histonas influenciando na expressão gênica. As modificações podem ser metilação (Me), acetilação (Ac) e fosforilação (P); e metilação de DNA.



Fonte: Oliveira (2014).

A ligação de grupos metil ao DNA torna o mesmo compacto e, consequentemente, dificulta a transcrição por meio de impedimento estérico. Níveis baixos de metilação geram ativação do DNA e, portanto, ativação de genes que favorecem o crescimento celular, perda de *imprinting* e instabilidade cromossômica (NORO; GON, 2015).

Para a maioria dos genes ambas as cópias têm funcionalidade, porém em alguns genes chamados *imprinted* (imprintados), uma cópia é desativada, podendo ser a de origem materna ou a paterna. Os indivíduos herdam duas cópias dos genes autossômicos, proveniente do pai e da mãe. A distinção entre os cromossomos herdados do pai ou da mãe ocorre durante o desenvolvimento embrionário. As regiões *imprinting* por serem efetivamente haplóides são mais suscetíveis a mutações recessivas e mudanças epigenéticas (COSTA; PACHECO, 2013).

A metilação do DNA trata-se de uma modificação química na molécula de DNA e tem a presença do radical metil em dinucleotídeos CpG, que estão presentes principalmente na região promotora, associada ao silenciamento dos genes (SILVA; JASIULIONIS, 2014). Segundo Oliveira (2014) os dinucleotídeos CpG podem aparecer dispersos ou agrupados em regiões chamadas de ilhas CpG, regiões do DNA nas quais aproximadamente 50% das bases são citosina e guanina e com a presença de aproximadamente 60% de dinucleotídeos CpG.

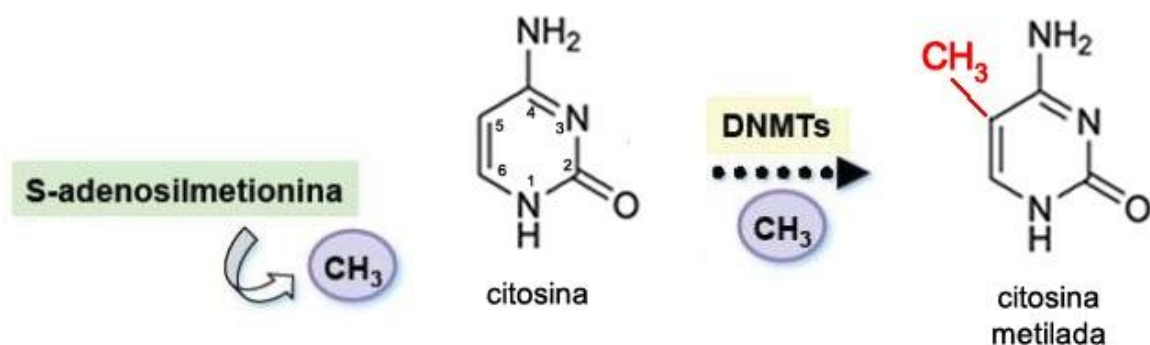
A região promotora do gene localizada próximo ao sítio de início de transcrição (denominado de +1), serve como local de ligação para a RNA polimerase e para fatores

transcricionais. Nesses locais, a metilação do DNA tem a função de definir o nível de transcrição gênica. Geralmente, ilhas de CpGs não metiladas nos promotores e estão sujeitas a transcrição, e promotores metilados tem a transcrição inativa (SILVA; JASIULIONIS, 2014).

As proteínas *Methyl Binding Proteins* (MBP – Proteína Ligante de Metil), se ligam a dinucleotídeos CpG por possuírem afinidade pelo grupo metil, os dinucleotídeos estão localizados nas regiões promotoras, essa ligação impede o acesso dos fatores de transcrição aos seus sítios. A MBP é composta por cinco membros, sendo que as mais estudadas são as MecP1 (*Methyl Cytosine Binding Protein* – Proteínas Ligantes de Metil Citosina), que necessitam de vários sítios CpGs próximos para que ocorra a ligação ao grupo metil, gerando a condensação da cromatina para a forma inativa e a proteína MecP2 que precisa de apenas um sítio CpG para fazer a ligação, promovendo alterações na cromatina igualmente às provocadas pela proteína MecP1 (OLIVEIRA et al., 2010).

De acordo com Muller e Prado (2008) o processo de metilação ocorre pela ação da família de enzimas DNA metiltransferases. A DNMT (DNA metiltransferase) catalisa a transferência de grupos metil para o DNA (Figura 2), a enzima DNMT1 mantém os padrões de metilação normais da célula durante a mitose, as DNMT3a e DNMT3b promovem uma nova metilação no DNA, principalmente nas ilhas CpG.

Figura 2: Processo de metilação do DNA envolvendo a ação das DNA metiltransferases (DNMTs). Transferência do grupamento metil da S-adenosilmetionina para o carbono 5' da citosina formando 5-metil-citosina.



Fonte: Dobner (2017). Adaptado pela autora (2017).

Existem duas classes de DNA metiltransferases: DNMT1 envolvida na metilação de fitas de DNA em processo de replicação (fitas hemimetiladas), que são denominadas metilases

de manutenção, essas reconhecem as fitas hemimetiladas e adicionam grupos metil às citosinas correspondentes; e outro grupo, que fazem parte as DNMT2, DNMT3a e DNMT3b, responsáveis pela maioria dos processos de metilação *de novo*, que ocorre em sítios sem a presença de metilação prévia, ou seja, com nenhum tipo de indicação de metilação (OLIVEIRA et al., 2010).

A partir da metilação do DNA e de outros mecanismos moleculares, que regulam os níveis de expressão do gene, ocasionam modificações epigenéticas que podem levar ao desenvolvimento de doenças subjacentes (KLEBANER et al., 2016). Como o câncer em diversos órgãos, doenças cardiovasculares e doenças respiratórias, totalizando aproximadamente 50 doenças causadas pelo uso do tabaco (MEIRELLES, 2009).

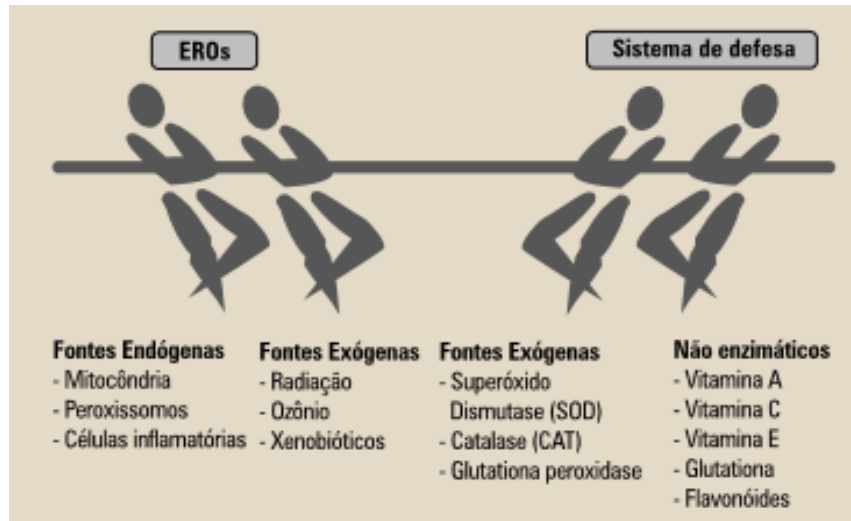
3.4 Estresse Oxidativo

Silva e Jasiulionis (2014) descrevem que na respiração ocorre o fluxo e difusão do oxigênio para as células do corpo, produzindo energia por meio do processo de metabolismo oxidativo.

O aumento do estado oxidante pode resultar na oxidação lipídica, na indução da quebra da fita simples do DNA, na inativação de certas proteínas e na ruptura de membranas biológicas, que estão associadas a numerosos efeitos adversos para a saúde de fetos, lactentes, crianças e adultos (YILDIRIM et al., 2011).

Na mitocôndria, organela na qual ocorre o processo de síntese de ATP por meio do transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa, o oxigênio pode ser reduzido parcialmente formando espécies reativas de oxigênio (EROs) como, por exemplo, O_2^- , H_2O_2 e OH^- . Os danos no DNA podem ocorrer devido ao estresse oxidativo, que é o desequilíbrio entre a produção e eliminação de EROs (SILVA; JASIULIONIS, 2014) (Figura 3).

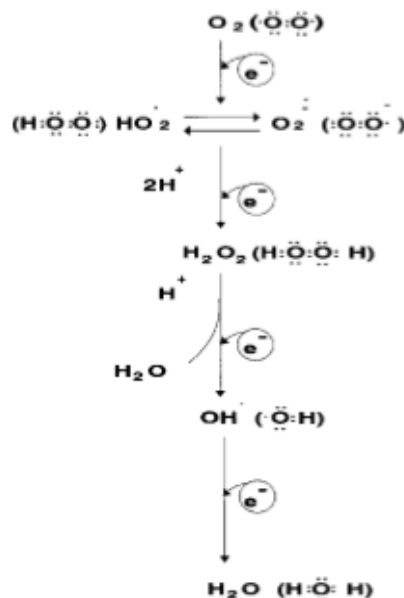
Figura 3: Equilíbrio entre produção de EROs e sistema de defesa, antioxidante.



Fonte: Silva e Jasiulionis (2014).

Na formação de água (H_2O) pelo metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente e, como resultado desse processo são formados intermediários reativos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997) (Figura 4).

Figura 4: Redução tetravalente do O_2 na mitocôndria até a formação de água.

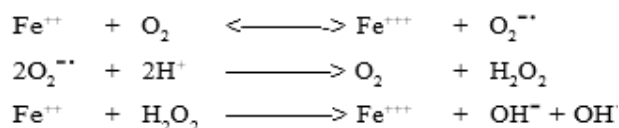


Fonte: Ferreira e Matsubara (1997).

A formação dos EROs *in vitro* é confirmada pelas reações de Fenton (Figura 5) e de Haber-Weiss (Figura 6). O ferro é o metal mais presente no organismo e habilitado para

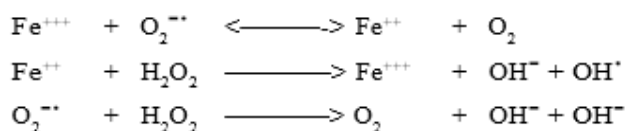
estimular as reações de oxidação de biomoléculas, porém o cobre também tem a capacidade de catalisar a reação de Haber-Weiss (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Figura 5: Reação de Fenton



Fonte: Ferreira e Matsubara (1997).

Figura 6: Reação de Haber-Weiss



Fonte: Ferreira e Matsubara (1997).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), participa da reação que produz o OH^\cdot , porém não é um radical livre. O H_2O_2 atravessa camadas lipídicas, podendo reagir com membranas das hemácias e com proteínas que são ligadas ao Fe^{+2} . Com esse poder de penetração o peróxido de hidrogênio é tóxico para as células, principalmente quando possuem a presença de ferro (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Ferreira e Matsubara (1997) citam que a síndrome da reperfusão pós-isquemia, possa estar relacionada à produção de espécies reativas de oxigênio via reação de Haber-Weiss, pois os experimentos com ratos submetidos à sobrecarga de Fe^{+3} mostrou que após a reperfusão ocorreu uma diminuição da contratilidade miocárdica sem lesão tissular significativa. Portanto, excesso de Fe^{+3} provoca o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e, consequentemente, de OH^\cdot , estimulando assim a lipoperoxidação de membranas que é a incorporação do radical livre aos ácidos graxos da membrana celular, ocorrendo o decréscimo da contratilidade do miocárdio.

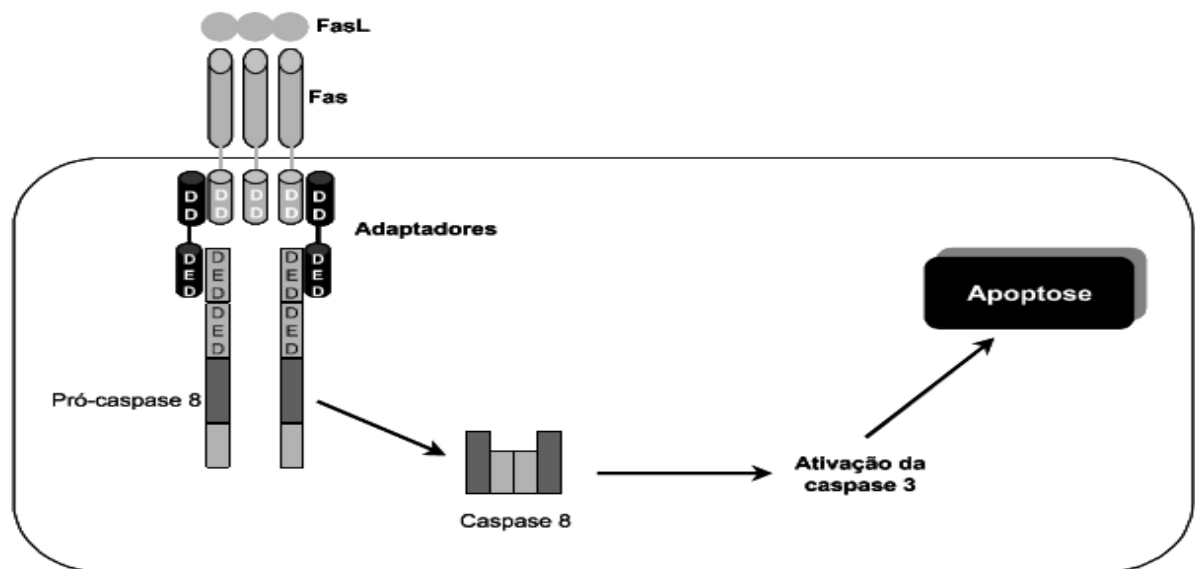
De acordo com Yildirim (2011) a fumaça do cigarro tem grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio e oxidantes. A fumaça do tabaco que origina radicais livres pode induzir direta ou indiretamente o estresse oxidativo no organismo, que tem uma influência considerável na evolução dos casos de câncer e de aterosclerose.

Os compostos emitidos em gases são a principal causa dos efeitos adversos do tabagismo. O estresse oxidativo, redução nos níveis de antioxidantes séricos e o aumento de

radicais livres estão relacionados com o crescimento da produção de espécies reativas de oxigênio, ocasionado pela fumaça do cigarro (YILDIRIM et al., 2011).

Danos no DNA podem desencadear a apoptose das células, pela via extrínseca por meio da maquinaria existente no citoplasma e pela via intrínseca pela ação da mitocôndria. A via extrínseca é estimulada por meio da ligação entre ligantes específicos e receptores como Fas/CD95, TRAIL e o receptor de fatores de necrose tumoral (rTNF), que possuem em seu subdomínio extracelular rico em cisteína, permitindo o reconhecimento dos ligantes. Com essa ligação a cascata das caspases é ativada. Após a ligação, ocorre a interação dos domínios de morte (DD) com as moléculas FADD/MORT-1, atraindo a caspase-8 que, por sua vez, ativa a caspase-3, desencadeando a morte celular por apoptose (GRIVICICH et al., 2007) (Figura 7).

Figura 7: Via extrínseca de ativação das caspases responsáveis pelo desencadeamento da apoptose.



Legenda: DD (domínio de morte); DED (efetor do domínio de morte).

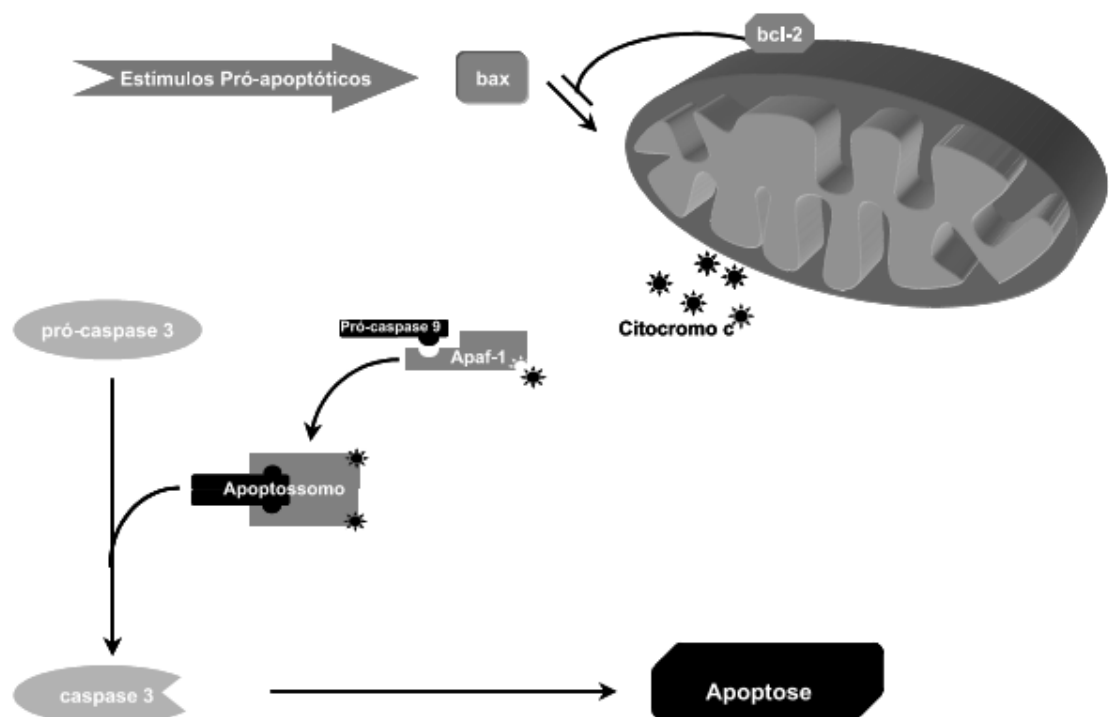
Fonte: Grivicich et al. (2007).

A via intrínseca (Figura 8) é estimulada pelo estresse intracelular ou extracelular como, por exemplo, danos no DNA. Os sinais de morte são convergidos para a mitocôndria, levando ao colapso da membrana mitocondrial interna ($\Delta\psi$) e a transição da permeabilidade mitocondrial (TPM). Ao mesmo tempo, ocorre a passagem da água do espaço entre as membranas para a matriz mitocondrial, provocando o rompimento da organela e liberando as proteínas pró-apoptóticas, por exemplo, Bax para a região do citoplasma. A perda da homeostasia das células interrompe a produção de ATP e aumenta a produção de EROS que

leva a oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos aumentando, consequentemente, o colapso do potencial da membrana mitocondrial interna. Os EROS também induzem a atividade das caspases-9 e -3 (GRIVICICH et al., 2007).

Segundo os estudos de Petros e colaboradores (2003) e Wetzel e Green (1999), estes indicam que durante a apoptose ocorre a formação de um megaporo que contém diversas proteínas e abrange as membranas interna e externa da mitocôndria. Através desse poro ocorre a liberação do citocromo c para o citoplasma onde participa da ativação das vias que levam à apoptose. Os diferentes sinais indutores de apoptose são detectados pela mitocôndria, fazendo com que ocorra um desacoplamento da cadeia respiratória e consequente liberação de citocromo c e proteínas ativadoras da apoptose para o citosol. Quando no citosol, o citocromo c forma um complexo com a APAF1 e a caspase-9, o chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9, ativa (Figura 8). Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 que vai ocasionar a apoptose (GRIVICICH et al., 2007).

Figura 8: Via intrínseca de ativação das caspases que levam à apoptose. Bcl-2 (reguladores antiapoptóticos); Bax (proteína pró-apoptóticas).



Fonte: Grivicich et al. (2007).

3.5 Influência do Tabagismo na Epigenética

A fumaça do cigarro é uma mistura química complexa que contém mais de 400 diferentes compostos, sendo que em torno de 69 deles são muito estudados e altamente associados ao câncer (OLIVEIRA, 2014).

A exposição a fumaça do tabaco está associada à evolução de diversos riscos a saúde de crianças e recém-nascidos como, por exemplo, autismo, alergia, asma, obesidade e dependência de nicotina (RZEHA et al., 2016).

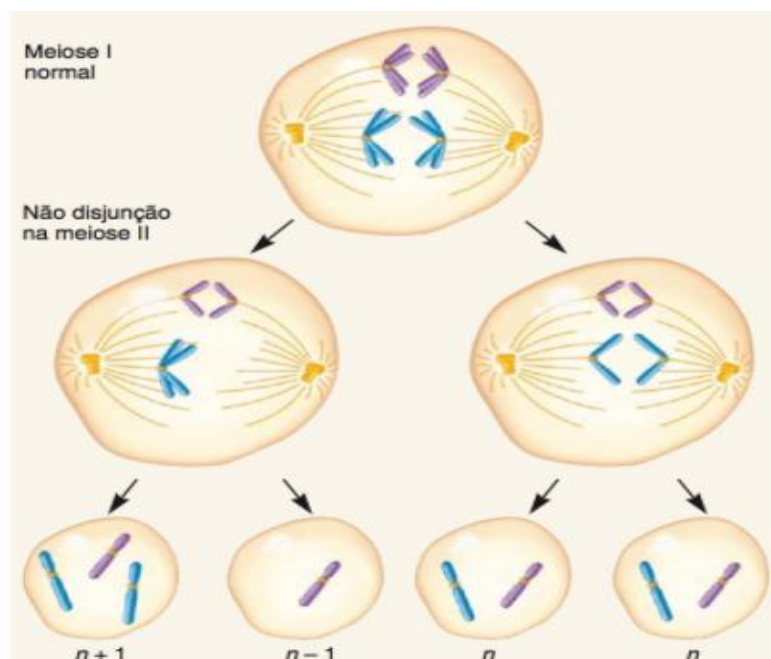
Alguns fatores como radiação ultravioleta, fármacos, uso crônico de álcool e o tabagismo interferem na metilação do DNA. O tabagismo é considerado como um tipo de óbito evitável. O risco do tabagismo está frequentemente associado com a evolução de doenças cardiovasculares e de gerar câncer em diversos tecidos (OLIVEIRA, 2014).

Em qualquer nível de consumo, o tabagismo é responsável por um envelhecimento biológico acelerado. O hábito crônico de cigarro tem efeitos significativos no estado de metilação em quase ¼ dos *loci* CpG no código genético (BEACH et al., 2015).

De acordo com Oliveira (2014) estudos revelam que recém-nascidos expostos a fumaça do cigarro produzida pelas mães, estão propensos a mutações gênicas. Além disso, foram encontradas aneuploidias, estresse oxidativo, quebras de molécula de DNA em espermatozoides de fumantes.

O fumo induz aneuploidia no espermatozoide em certos cromossomos, incluindo 1, 13 e YY dissômico, mas não afeta outros cromossomos, como XY, XX ou 7. O espermatozoide de fumantes tem níveis elevados de não-disjunção na meiose II (Figura 9) dos cromossomos sexuais em relação ao de não fumantes. Além disso, homens inférteis que são fumantes tem níveis altos de estresse oxidativo seminal se comparado com não fumantes inférteis (DEMARINI, 2004).

Figura 9: Esquema ilustrativo mostrando o evento de não disjunção que ocorre na meiose II.



Fonte: Schaefer e Thompson (2015).

No trabalho desenvolvido por Allione e colaboradores (2015) foi realizado um estudo com gêmeos monozigóticos (MZ) pois são considerados geneticamente “idênticos”. Nesse estudo foram analisados um grupo de MZ discordantes para o hábito de fumar, sendo possível identificar mudanças de metilação do DNA relacionadas com o tabagismo independente dos componentes genéticos. Utilizaram 20 pares de gêmeos MZ investigando os perfis de metilação do DNA do genoma de sangue total. Identificaram 22 *loci* de CpG diferencialmente metilados entre gêmeos fumantes e não fumantes, confirmaram oito *loci* já descritos anteriormente por outros grupos, localizados nos genes *AHRR*, *F2RL3*, *MYOG1* nas regiões 2q37.1 e 6p21.33 e, também, identificaram vários outros novos *loci*. De acordo com esse estudo, concluíram que fica evidente as modificações nos perfis epigenéticos de vários genes influenciados pelas exposições ambientais, principalmente, o tabagismo.

Segundo Oliveira (2014) foram observadas alterações em vários sítios do dinucleotídeo CpG de células sanguíneas, encontrando uma semelhança entre indivíduos que nunca fumaram e ex-fumantes. Com essa análise da metilação do genoma, verificou-se que ao parar de fumar é possível recuperar o estado de metilação do DNA. O estudo confirma os trabalhos anteriores nos quais o hábito de fumar cigarros gera a metilação do DNA.

No estudo realizado por Zeilinger e colaboradores (2013) foi possível verificar que em ex-fumantes os níveis de metilação da maioria dos sítios de CpG, que eram diferencialmente metilados em usuários ativos comparado com não fumantes, foram parecidos ao estado

encontrado em pessoas que nunca fumaram. Além disso, o gene *AHRR* foi considerado o conjunto de sondas com maior significado entre os não fumantes e atuais fumantes, observaram que após a cessação do tabagismo, a expressão desse gene caiu, mas as mudanças diminuíram substancialmente nos últimos anos, nunca atingindo o nível de pessoas que nunca fumaram, o que corresponde ao progresso das alterações na metilação do DNA que detectaram dentro desse gene. No entanto, as mudanças observadas na metilação do DNA em antigos fumantes não ocorreram somente pelo tempo de cessação, mas também o tempo acumulado de exposição a fumaça.

As modificações epigenéticas ocasionadas pelo fumo podem ser tanto a curto prazo quanto a longo prazo, que podem contribuir para a expressão fenotípica de várias doenças. O tabagismo é uma das principais causas de doenças crônicas (KLEBANER et al., 2016).

No estudo realizado por Hayase (2016) a exposição da nicotina em ratos teve um impacto negativo nas vias neurais dos cérebros em desenvolvimento, gerando deficiência pré-natal que incluem alterações a longo prazo na sensibilidade à nicotina.

Muitas mulheres continuam com o hábito de fumar durante a gravidez, prejudicando negativamente antes mesmo do nascimento da criança. O tabagismo materno é o fator de risco evitável mais importante para a Síndrome da Morte Súbita Infantil, que gera atrasos de desenvolvimento no controle neural da função cardiopulmonar. Também é possível observar que filhos de fumantes são mais propensos a doenças respiratórias como, por exemplo, a asma (LESLIE, 2013).

Segundo Alberg e Korte (2014) o risco da prole de fumar é maior nos casos em que as mães fumaram antes, durante e após a gravidez do que nos casos em que as mães fumaram antes e depois, mas não durante a gravidez. Portanto, o tabagismo materno especificamente durante a gravidez pode contribuir para além do ambiente social durante a infância.

A nicotina tem efeito direto nos receptores nicotínicos no cérebro do feto. Portanto, é possível que a exposição ao tabaco durante a gravidez tenha um impacto na propensão para fumar. Estudos relacionados a marcadores epigenéticos estão em andamento, mas foram comparadas proles que não foram expostas ao tabaco e os fetos que tiveram essa exposição. Com a comparação de expostos e não expostos, foi possível observar diferentes marcadores específicos de metilação do DNA dessas crianças (ALBERG; KORTE, 2014).

De acordo com o estudo realizado por Buka e colaboradores (2003) a nicotina que é transmitida da mãe ao feto estimula receptores nicotínicos, que estão presentes nos estágios iniciais do desenvolvimento fetal. Este hábito de fumar durante a gravidez pode causar anormalidades permanentes na regulação dopaminérgica do cérebro. Mesmo com baixas doses

de nicotina e na ausência de anormalidades notáveis do feto, esses efeitos podem resultar em uma maior responsabilidade para a dependência da nicotina do que naqueles que não foram expostos à fumaça do tabaco no útero.

As consequências de uma gravidez na qual a mãe fuma pode ter efeitos duradouros, pois em sistemas imaturos a estimulação do receptor interage com os genes que controlam a diferenciação celular, alterando permanentemente a capacidade de resposta da célula, ao contrário do que ocorre nos organismos maduros, onde a estimulação de uma célula-alvo tem uma resposta de curto prazo (BUKA et al., 2003).

Segundo Santos (2011), a genética e o ambiente se complementam e, devido ao comportamento multifatorial é difícil explicar a diferença entre pessoas que são dependentes da nicotina e outras que são fumantes ocasionais ou, até mesmo, a evitam.

A interação química com os agentes capazes de gerar uma mutação genética, denominados de agentes genotóxicos, provocam lesões que em sua maioria o próprio organismo corrige ou a célula é eliminada. Porém, se essas lesões se fixarem podem ser passadas para células filhas, alterando os progenitores (BERSCH; PÉRICO; POZZOBON, 2014).

Oliveira (2011) citou os principais genes afetados pelas alterações epigenéticas, envolvendo cânceres pulmonares, cabeça, pescoço, pâncreas, bexiga, útero e intestino, bem como, amostras saudáveis de sangue, escarro e pulmão. Classificaram a primeira categoria como primária pois há correlação entre o câncer, hábito de fumar e alterações de metilação; e a categoria secundária associando os tecidos saudáveis, hábito de fumar e alterações de metilação (Quadro 1).

Quadro 1: Síntese dos artigos revisados relacionando o câncer, metilação aberrante de DNA, hábito de fumar e síntese dos artigos revisados relacionados a tecidos saudáveis, metilação de DNA e hábito de fumar.

| AMOSTRAS DE CÂNCER | | | | | |
|-------------------------------|----------------------|----------------------|---|---|--|
| Autores | Número de indivíduos | Tipo de estudo | Amostra | Genes estudados | Genes alterados – metilação aberrante (valor de p) |
| JIN et al. (2010) | 300 | Caso-controle | Pulmão | <i>p16, DAPK, RARβ</i> | Hipermetilação (< 0,01) |
| LIN et al. (2007) | 100 | Coorte retrospectiva | Pulmão | <i>FHIT, p16^{INK4a}, RARβ</i> | Hipermetilação (< 0,05) |
| SHARMA, PANDA, KHULLAR (2010) | 73 | Caso-controle | Cabeça e pescoço (cavidade oral, faringe e laringe) | <i>CYP1A1, CYP2A13, GSTM1</i> | Hipermetilação CYP1A1 (= 0,029) CYP2A13 (=0,034) |
| GAO et al. (2010) | 40 | Coorte prospectiva | Pâncreas | <i>SPARC</i> | Hipermetilação (= 0,017) |
| WOLFF et al. (2009) | 342 | Coorte retrospectiva | Bexiga | <i>BCL2, PTGS2, DAPK, CDHT (ECAD), EDNRB, RASSF1A, RUNX3, TERT, TIMP3</i> | Hipermetilação RUNX3 (= 0,015) |
| LEA et al. (2004) | 60 | Caso-controle | Útero | <i>p16</i> | Hipermetilação (< 0,001) |
| LIMSUI et al. (2010) | 555 | Coorte prospectiva | Intestino | <i>CACNA1G, JGF2, NEUROG1, RUNX3, SOCS1</i> | Hipermetilação (< 0,05) |
| AMOSTRAS LIVRES DE CÂNCER | | | | | |
| CHRISTENSEN et al. (2009) | 53/112 | Coorte prospectiva | Pulmão/sangue | <i>MLH1, RIPK3</i> | Hipermetilação (< 0,001/) |
| BARYSHNIKOVA et al. (2008) | 820 | Coorte prospectiva | Escarro | <i>RASSF1A, NORE1A</i> | Hipermetilação (< 0,05) |
| BELINSKY et al. (2002) | 32 | Caso-controle | Pulmão/escarro | <i>p16, DAP Kinase</i> | Hipermetilação p16 (< 0,05) |

Fonte: Oliveira (2011).

O cigarro não altera somente o epigenoma de órgãos diretamente expostos, tais como: o pâncreas, a bexiga, o útero e o intestino, sugerindo que o efeito é generalizado, podendo afetar diversos órgãos do organismo humano (OLIVEIRA, 2011).

De acordo com o estudo realizados por Verde e colaboradores (2016) confirmam que a mutação no gene *CYP1A1* (Ile462Val), em associação com um longo período de tabagismo ativo é um possível fator de risco de câncer de mama, principalmente quando estão expostas por um longo período de tempo ou quando começam a fumar cedo. Os agentes causadores de câncer presentes na fumaça do tabaco passam pela membrana dos alvéolos pulmonares e na corrente sanguínea, que através de lipoproteínas plasmáticas podem ser transportados para o coração e outros órgãos.

Durante a pré-puberdade o tecido mamário é mais suscetível a exposições cancerígenas, devido a proliferação celular elevada e a capacidade de diminuição dos mecanismos de reparo do DNA para corrigir os danos antes da ocorrência da célula. Foi possível observar também que o diagnóstico precoce de câncer de mama é significativo (VERDE et al., 2016).

4 Considerações Finais

Com o desenvolvimento do trabalho foi observado que fatores ambientais influenciam as mudanças químicas no DNA, modificando a expressão gênica, demonstrando a relação entre o tabagismo, a metilação do DNA e o surgimento de várias doenças.

Várias substâncias tóxicas são encontradas na fumaça do cigarro, dentre elas a nicotina foi observada como a principal para o surgimento do câncer em diferentes órgãos e outras doenças. O ato de fumar gera uma combustão, elevando a temperatura nas vias aéreas e a produção de radicais livres. A presença do radical metil no DNA torna o mesmo compacto e impede a transcrição, ocorrendo o silenciamento do gene e, com essa regulação da expressão do gene, ocorrem as modificações epigenéticas e por consequência o desenvolvimento de doenças subjacentes.

A fumaça do cigarro possui grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio, induzindo o estresse oxidativo, que por sua vez gera danos no DNA desencadeando a apoptose das células.

Algumas pesquisas analisadas nesse estudo citaram os genes mais afetados pelas alterações epigenéticas, envolvendo as principais doenças. Mostrando ainda que o tabagismo não afeta somente a pessoa usuária, mas também os espermatozoides dos fumantes, recém-nascidos expostos a fumaça durante a gravidez da mãe e fumantes passivos. Porém, foi possível observar que ao parar de fumar é possível recuperar o estado de metilação do DNA, mesmo que lentamente e com a presença de algumas variáveis.

As conclusões do presente trabalho evidenciam que o tabagismo é um tipo de óbito evitável, sendo que o uso do tabaco prejudica a saúde. Mostrando que o biomédico como profissional da saúde tem o papel de demonstrar os malefícios do cigarro, alertando a população, por meio de pesquisas e tratamentos de doenças decorrentes do consumo de tabaco.

5 Referências

ALBERG, A. G.; KORTE, J. E. Invited commentary: parental smoking as a risk factor for adult tobacco use: can maternal smoking during pregnancy be distinguished from the social environmental influence during childhood? **American Journal of Epidemiology**, Cary, v. 179, n. 12, p. 1418-1421, jan. 2014.

ALLIONE, A. et al. Novel epigenetic changes unveiled by monozygotic twins discordant for smoking habits. **Plos One**, San Francisco, v. 10, n. 6, p. 1-11, jun. 2015.

BEACH, S. R. H. et al. Methylomic aging as a window onto the influence of lifestyle: tobacco and alcohol use alter the rate of biological aging. **Journal of the American Geriatrics Society**, New York, v. 63, n. 12, p. 2519-2525, dez. 2015.

BERSCH, B. R.; PÉRICO, E.; POZZOBON, A. Verificação de dano no DNA de células sanguíneas em adultos jovens consumidores de tabaco. **Caderno pedagógico**, Lajeado, v. 11, n. 1, p. 8-19, jan./jun. 2014.

BUKA, S. L. et al. Elevated risk of tobacco dependence among offspring of mothers who smoked during pregnancy: a 30-year prospective study. **The American Journal of Psychiatry**, Virginia, v. 160, n. 11, p. 1978-1984, nov. 2003.

CONSOLARO, A. O gene e a epigenética: as características dentárias e maxilares estão relacionadas com fatores ambientais ou os genes não comandam tudo! ou o determinismo genético acabou?. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, Maringá, v. 14, n. 6, p. 14-18, nov./dez. 2009.

CORDEIRO, A. M. et al. Revisão sistemática: uma revisão narrativa. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 6, p. 428-431, nov./dez. 2007.

COSTA, E. B. O.; PACHECO, C. Epigenética: regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 125-136, jul./dez. 2013.

DEMARINI, D. M. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. **Mutation Research**, North Carolina, v. 567, n. 2-3, p. 447-474, fev. 2004.

DOBNER, T. **Epigenética**, 2017. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAABYRIA/epigenetica>. Acesso em: 16 nov. 2017.

FANTAPPIÉ, M. **Epigenética e memória celular**, 2013. Disponível em: <http://revistacarbono.com/artigos/03-epigenetica-e-memoria-celular-marcelofantappie/>. Acesso em: 11 set. 2016.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, mar. 1997.

GRIVICICH, I. et al. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 3, p. 335-343, jan. 2007.

HAYASE, T. Putative epigenetic involvement of the endocannabinoid system in anxiety- and depression-related behaviors caused by nicotine stressor. **Plos One**, San Francisco, v. 11, n. 7, p. 1-21, jul. 2016.

INCA (Instituto Nacional do Câncer). **Tabagismo um grave problema de saúde pública**. Rio de Janeiro: INCA, 2007.

KLEBANER, D. et al. X chromosome-wide analysis identifies DNA methylation sites influenced by cigarette smoking. **Clinical Epigenetics**, Cambridge, v. 20, n. 8, p. 1-10, fev. 2016.

LESLIE, F. M. Multigenerational epigenetic effects of nicotine on lung function. **BMC Medicine**, San Francisco v. 27, n. 11, p. 1-4, fev. 2013.

MALTA, D. C. et al. Tendência de fumantes na população Brasileira segundo a Pesquisa Nacional de Amostra de Domicílios 2008 e a Pesquisa Nacional de Saúde 2013. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 45-56, dez. 2015.

MARTINS, G. A. et al. Tabagismo entre acadêmicos do curso de farmácia noturno das faculdades unidas do vale do Araguaia. **Interdisciplinar: Revista Eletrônica da UNIVAR**, Barra do Garças, v. 1, n. 15, p. 184-188, set. 2016.

MEIRELLES, R. H. S. Tabagismo e DPOC – dependência e doença – fato consumado. **Pulmão RJ - Atualizações Temáticas**, Rio de Janeiro, v. 1 n. 1, p. 13-19, jan. 2009.

MULLER, H. R.; PRADO, K.B. Epigenética: um novo campo da genética. **RUBS**, Curitiba, v.1, n.3, p. 61-69, set./dez. 2008.

NAKAJIMA, M. et al. Interindividual differences in nicotine metabolism and genetic polymorphisms of human *CYP2A6*. **Drug Metabolism Reviews**, New York, v. 34, n. 4, p. 865-877, nov. 2002.

NORO, G.; GON, M. C. C. Epigenética, cuidados maternos e vulnerabilidade ao estresse: conceitos básicos e aplicabilidade. **Psychology/Psicologia Reflexão e Crítica**, Porto Alegre, v. 28, n. 4, p.829-839, abr. 2015.

NUNES, E. Consumo de tabaco. Efeitos na saúde. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, Lisboa, v. 22, n. 2, p. 225-244, mar./abr. 2006.

OLIVEIRA, N. F. P. et al. Metilação de DNA e câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 56, n. 4, p. 493-499, set. 2010.

OLIVEIRA, N. F. P. Alterações no epigenoma e o hábito de fumar. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, João Pessoa, v. 14, n. 4, p. 101-106, out./dez. 2011.

OLIVEIRA, S. R. L. **Efeito do tabagismo no perfil de metilação de DNA no promotor dos genes MHL1, hTERT e TP53 em células epiteliais da mucosa bucal**. 2014. 58 f. Dissertação (Mestrado) do Centro de Ciências da Saúde Programa de Pós-Graduação em Odontologia Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

PAES, N. L. Fatores econômicos e diferenças de gênero na prevalência do tabagismo em adultos. **Revista Ciência e Saúde Coletiva da Associação Brasileira de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 21, n.1, p. 53-61, jan. 2016.

PETROS, A. M. et al. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Chicago, v. 1644, n. 2-3, p. 83-94, mar. 2004.

RUFINO, R.; SILVA, J. R. L. Bases celulares e bioquímicas da doença pulmonar obstrutiva crônica. **Jornal brasileiro de pneumologia**. São Paulo, v. 32, n. 3, p. 241-248, jun. 2006.

RZEHAK, P. et al. Maternal smoking during pregnancy and DNA-methylation in children at age 5.5 years: epigenome-wide-analysis in the european childhood obesity project (CHOP)-study. **Plos One**, San Francisco, v. 11, n. 5, p. 1-18, maio. 2016.

SANTOS, V. A. **Inter-relações entre tabagismo, sintomas depressivos e genética**. 2011. Doutorado (Tese) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Doutorado em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Clínica Médica., Porto Alegre, 2011.

SCHAEFER, G. B.; THOMPSON, J. **Genética médica: uma abordagem integrada**. Porto Alegre: AMGH, 2015.

SILVA, A. E. C. **Responsabilidade civil do fabricante de cigarro**. 2006. Pós-Graduação "lato sensu" em Direito do Consumidor (Monografia) – Universidade Candido Mendes, Rio de Janeiro, 2006.

SILVA, C. T.; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 38-42, 2014.

VERDE, Z. et al. Effect of genetic polymorphisms and long-term tobacco exposure on the risk of breast cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 17, n. 10, p. 1-11, out. 2016.

WETZEL, E. B.; GREEN, D. R. Apoptosis: checkpoint at the mitochondrial frontier. **Mutation Research**, San Diego, v. 434, n. 3, p. 243-251, maio 1999.

YILDIRIM, F. et al. Aumento do estresse oxidativo em pré-escolares expostos ao tabagismo passivo. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 87, n. 6, p. 523-528, ago. 2011.

ZEILINGER, S. et al. Tobacco smoking leads to extensive genome-wide changes in DNA methylation. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 5, p. 1-14, abr. 2013.